

## NUCLEIC ACID SENSITIVE DETECTION PROCESS

Patent Number: WO9206216

Publication

date: 1992-04-16

Inventor(s): KESSLER CHRISTOPH (DE); BERNER SIBYLLE (DE); RUEGER RUEDIGER (DE);  
SEIBL RUDOLF (DE); KRUSE-MUELLER CORNELIA (DE)

Applicant(s): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)

Requested

Patent: □ WO9206216

Application

Number: WO1991EP01898 19911004

Priority Number

(s): DE19904032024 19901009; DE19904038804 19901205; DE19904041608 19901222

IPC

Classification: C12Q1/68

EC

Classification: C12Q1/68D8, C12Q1/68D2G, C12Q1/68D4

Equivalents:

AU655781, AU8627591, CA2093647, □ EP0552203 (WO9206216), B1, ES2073771T,  
□ FI103808B, FI931586, IE68525, □ IE913552, IL99663, JP2673162B2, JP6501157T,  
NO305995B, NZ240079, □ PT99177

### Abstract

A process is disclosed for specifically detecting nucleic acids in a sample. The sample is reacted with one or several labeled nucleotide triphosphates and one or several enzymes which catalyze the production of a labeled nucleic acid B containing said nucleotide. Then the sample is subjected to a non thermal denaturation and reacted with a nucleic acid probe C which is sufficiently complementary to nucleic acid B and which contains at least one immobilizable group. The possibly formed nucleic acid hybrid D is contacted with a solid phase which recognizes and binds the immobilizable group, the liquid phase is removed from the solid phase and the labeling of the solid phase is considered as a measure of the presence of nucleic acids.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2



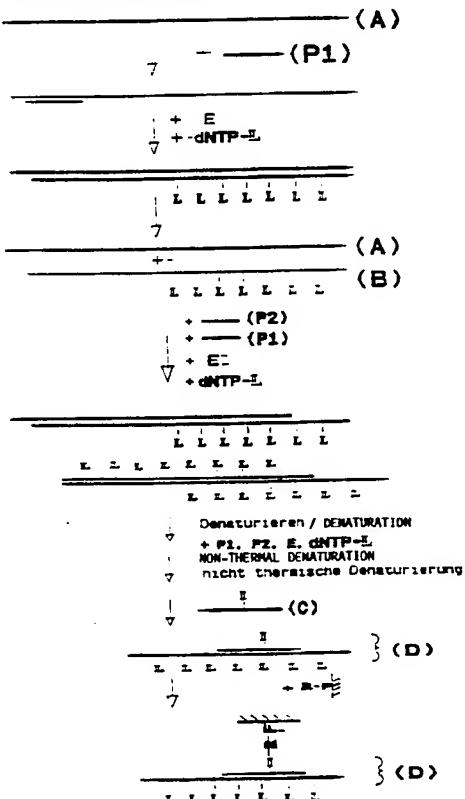
**PCT**

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 5 :</b> <b>C12Q 1/68</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 92/06216</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> <b>16. April 1992 (16.04.92)</b>
<p><b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> <b>PCT/EP91/01898</b></p> <p><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> <b>4. Oktober 1991 (04.10.91)</b></p> <p><b>(30) Prioritätsdaten:</b>            P 40 32 024.3 9. Oktober 1990 (09.10.90) DE            P 40 38 804.2 5. Dezember 1990 (05.12.90) DE            P 40 41 608.9 22. Dezember 1990 (22.12.90) DE         </p> <p><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).</p> <p><b>(72) Erfinder; und</b>  <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> KESSLER, Christoph [DE/DE]; Schloßbergweg 11, D-8021 Dorfen (DE). RÜGER, Rüdiger [DE/DE]; Tutzinger Str. 2, D-8124 Seeshaupt (DE). SEIBL, Rudolf [DE/DE]; Saalangerstr. 46, D-8122 Penzberg (DE). KRUSE-MÜLLER, Cornelia [DE/DE]; Beringerweg 10, D-8132 Tutzing (DE). BERNER, Sibylle [DE/DE]; Goethestr. 62, D-8900 Augsburg 1 (DE).</p>			
<p><b>(74) Anwälte:</b> KOLB, Bernd usw. ; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).</p> <p><b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), BG, BR, CA, CH (europäisches Patent), CS, DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, KR, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), NO, PL, RO, SE (europäisches Patent), SU<sup>+</sup>, US.</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>			
<p><b>(54) Title:</b> NUCLEIC ACID SENSITIVE DETECTION PROCESS</p> <p><b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUM EMPFINDLICHEN NACHWEIS VON NUKLEINSÄUREN</p> <p><b>(57) Abstract</b></p> <p>A process is disclosed for specifically detecting nucleic acids in a sample. The sample is reacted with one or several labeled nucleotide triphosphates and one or several enzymes which catalyze the production of a labeled nucleic acid B containing said nucleotide. Then the sample is subjected to a non thermal denaturation and reacted with a nucleic acid probe C which is sufficiently complementary to nucleic acid B and which contains at least one immobilizable group. The possibly formed nucleic acid hybrid D is contacted with a solid phase which recognizes and binds the immobilizable group, the liquid phase is removed from the solid phase and the labeling of the solid phase is considered as a measure of the presence of nucleic acids.</p> <p><b>(57) Zusammenfassung</b></p> <p>Verfahren zum spezifischen Nachweis von Nukleinsäuren in einer Probe durch Reaktion der Probe mit einem oder mehreren markierten Nukleotidtriphosphaten und einem oder mehreren Enzymen, welche die Herstellung einer markierten Nukleinsäure B katalysieren, die dieses Nukleotid enthält, nichtthermische Denaturierung, Reaktion der Probe mit einer Nukleinsäuresonde C, die hinreichend komplementär zu Nukleinsäure B ist und mindestens eine immobilisierbare Gruppe enthält, Inkontaktbringen des gegebenenfalls gebildeten Nukleinsäurehybrids D mit einer festen Phase, die die immobilisierbare Gruppe erkennt und bindet, Entfernen der flüssigen von der festen Phase und Bestimmung der Markierung an der festen Phase als Maß für die Anwesenheit der Nukleinsäure.</p>			



#### + BESTIMMUNGEN DER "SU"

Die Bestimmung der "SU" hat Wirkung in der Russischen Föderation. Es ist noch nicht bekannt, ob solche Bestimmungen in anderen Staaten der ehemaligen Sowjetunion Wirkung haben.

#### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU+	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Verfahren zum empfindlichen Nachweis von Nukleinsäuren

Gegenstand der Patentanmeldung ist ein Verfahren zum spezifischen Nachweis einer Nukleinsäure oder eines Teils davon.

Der Nachweis von Nukleinsäuren in der klinischen Diagnostik und der Molekularbiologie hat in jüngster Zeit gegenüber den klassischen Immuntests immer mehr an Bedeutung gewonnen. Dies hängt damit zusammen, daß Fortschritte im Hinblick auf die Erforschung der Nukleotid-Sequenz von Nukleinsäuren verschiedenen Ursprungs gemacht wurden.

Da die in der Nukleotidsequenz enthaltenen Informationen sehr differenziert sind, kann die Nukleinsäurediagnostik besonders vorteilhaft zur Unterscheidung geringster Merkmale eingesetzt werden. Dies ist beispielsweise wichtig beim Nachweis von Mutationen und Unterschieden in künstlich erzeugten Sequenzen. Durch die Einführung von Amplifizierungsverfahren konnte die Empfindlichkeit von Nukleinsäurenachweisen erheblich gesteigert werden.

Ein solches Verfahren ist beispielsweise in der EP-A-0 200 362 beschrieben. Der Amplifikationseffekt beruht im wesentlichen darauf, daß aus einer sogenannten target-Nukleinsäure als template mit Hilfe eines Primers und Mononukleosidtriphosphaten ein Verlängerungsprodukt des Primers gebildet wird, das entweder nachgewiesen wird oder selbst wieder als template-Nukleinsäure verwendet werden

- 2 -

kann. Dabei kann in das Verlängerungsprodukt auch ein nachweisbares Nukleotid eingebaut werden. Das entstandene Verlängerungsprodukt kann elektrophoretisch nachgewiesen werden.

Diese Nachweismethode ist jedoch wegen des umständlichen und zeitaufwendigen Elektrophoreseschritts nachteilig.

Das nicht markierte Verlängerungsprodukt kann gemäß EP-A-0 201 184 auch durch Hybridisierung mit einer nachweisbar markierten Nukleinsäuresonde nachgewiesen werden. Die Abtrennung des Hybrids aus Verlängerungsprodukt und Sonde von unumgesetzter Sonde ist jedoch mit dem dort beschriebenen Verfahren wegen unspezifischer Wechselwirkungen entweder ineffizient oder mit vielen Waschschritten verbunden, welche die Empfindlichkeit herabsetzen.

In der WO 89/11546 wird ein Verfahren vorgeschlagen, bei dem amplifizierte, festphasengebundene Nukleinsäuren mit einem Primer und markierten Mononukleotiden umgesetzt werden, wobei die dabei gebildeten markierten Nukleinsäuren nachgewiesen werden. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß alle maßgeblichen Reaktionen an der festen Phase ablaufen, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit beeinträchtigt ist. Auch in der EP-A-0 324 474 wird ein solches Verfahren vorgeschlagen, bei dem markierte Mononukleotide eingebaut und diese markierten Nukleinsäuren mit zur nachzuweisenden Nukleinsäure komplementären immobilisierten Nukleinsäuren abgefangen werden. Über die Methode der Denaturierung der amplifizierten Nukleinsäuren und die Hybridisierungsbedingungen ist nichts ausgesagt. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens ist, daß die

Herstellung effizient festphasengebundener Nukleinsäuren aufwendig ist.

In der EP-A-0 357 011 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem in die Verlängerungsreaktion zwei Primer eingesetzt werden, von denen einer nachweisbar markiert und der andere zur Bindung an eine feste Phase geeignet ist. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß es aufwendiger ist, nachweisbar markierte Oligonukleotide von den diese Oligonukleotide beinhaltenden Verlängerungsprodukten abzutrennen. Wenn keine Abtrennung vorgenommen wird, ist wegen Konkurrenzreaktionen eine verringerte Sensitivität zu erwarten.

In der EP-A-0 297 379 und der EP-A-0 348 529 ist ein Verfahren beschrieben, bei dem ein immobilisierter oder immobilisierbarer Primer unter Zuhilfenahme der target-Nukleinsäure als template mit einem detektierbaren Mononukleotid zu einer immobilisierten und gleichzeitig nachweisbar markierten Nukleinsäure verlängert wird. Dieses Verfahren hat u.a. den Nachteil, daß die Spezifität des Nachweises nicht sehr hoch ist. Das ebenfalls in EP-A-0 297 379 beschriebene Verfahren, bei dem nur ein immobilisierter oder immobilisierbarer Primer eingesetzt wird, woraufhin die Verlängerungsprodukte mit einem markierten Oligonukleotid umgesetzt werden, hat den bei EP-A-0 357 011 beschriebenen Nachteil der erschwerten Abtrennbarkeit des Oligonukleotids.

In der WO 89/09281 ist ein Verfahren beschrieben, bei dem die beiden Primer dieselbe chemische Gruppe aufweisen, die einmal zur Immobilisierung und zum anderen zum Nachweis verwendet wird. Dies verstärkt den oben genannten Nachteil der schlechten Abtrennbarkeit noch.

In Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, pp 6230-6234 wird ebenfalls ein Verfahren geschildert, in dem ein nachweisbar markierter Primer verlängert wird. Der Nachweis erfolgt nach Bindung der Verlängerungsprodukte an eine Fangprobe. Auch hier ist die Abtrennung des nachweisbar markierten Primers nicht ohne Zusatzschritte möglich, und er stört daher die Nachweisreaktion.

Es war daher Aufgabe der Erfindung, die Nachteile des Verfahrens des Standes der Technik zu vermeiden und insbesondere ein Nukleinsäurenachweisverfahren bereitzustellen, welches hohe Spezifität oder Selektivität mit geringem Hintergrundsignal verbindet.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum spezifischen Nachweis einer Nukleinsäure in einer Probe, welches folgende Schritte umfaßt:

- a) Reaktion der Probe mit einem oder mehreren markierten Mononukleosidtriphosphaten und einem oder mehreren Enzymen, welche die Herstellung einer markierten Nukleinsäure B katalysieren, die dieses Nukleotid enthält,
- b) Reaktion der Probe mit einer Nukleinsäuresonde C, welche hinreichend komplementär zu der Nukleinsäure B ist,
- c) Nachweis des aus markierter Nukleinsäure B und Nukleinsäuresonde C gebildeten Nukleinsäurehybrids D,
- d) wobei die Nukleinsäuresonde C mindestens eine immobilisierbare Gruppe enthält,

- 5 -

- e) die Reaktionsmischung nach Schritt a) einer nicht thermischen Denaturierung unterzogen wird,
- f) das Nukleinsäurehybrid D mit einer festen Phase, welche die immobilisierbare Nukleinsäuresonde C spezifisch binden kann, in Kontakt gebracht wird,
- g) die flüssige von der festen Phase getrennt wird und
- h) die an die feste Phase gebundene nachweisbare Gruppe nachgewiesen wird.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform der sogenannten Hybridisierungstests, die in ihren Grundzügen dem Fachmann auf dem Gebiet der Nukleinsäurediagnostik bekannt sind. Soweit experimentelle Details im folgenden nicht ausgeführt sind, wird dazu vollinhaltlich auf "Nucleic acid hybridisation", Herausgeber B.D. Hames und S.J. Higgins, IRL Press, 1986, in den Kapiteln 1 (Hybridisation Strategy), 3 (Quantitative Analysis of Solution Hybridisation) und 4 (Quantitative Filter Hybridisation), Current Protocols in Molecular Biology, Edt. F.M. Ausubel et al., J. Wiley and Son, 1987, 2.9.1. - 2.9.10 und Molecular Cloning, Edt. J. Sambrook et al., CSH, 1989, 9.4.7. - 9.5.8. Bezug genommen. Dazu gehören insbesondere die bekannten Methoden zur Herstellung von markierten Nukleosidtriphosphaten, wie sie auch in EP-A-0 324 474 beschrieben sind, die chemische Synthese von modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotiden, die Spaltung von Nukleinsäuren mittels Restriktionsenzymen, die Auswahl von Hybridisierungsbedingungen, durch welche eine Spezifität erreicht werden kann, die vom Ausmaß der Homologie

zwischen den zu hybridisierenden Nukleinsäuren, deren GC-Gehalt und deren Länge abhängt, sowie die Bildung von Nukleinsäuren aus Nukleosidtriphosphaten mit Hilfe von Polymerasen, gegebenenfalls unter Verwendung von sogenannten Primern.

Eine Markierung im Sinne der vorliegenden Erfindung besteht aus einer direkt oder indirekt nachweisbaren Gruppe L. Direkt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise radioaktive (<sup>32</sup>P), farbige, oder fluoreszierende Gruppen oder Metallatome. Indirekt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise immunologisch oder enzymatisch wirksame Verbindungen, wie Antikörper, Antigene, Haptene oder Enzyme oder enzymatisch aktive Teilenzyme. Diese werden in einer nachfolgenden Reaktion oder Reaktionssequenz detektiert. Besonders bevorzugt sind Haptene, da mit ihnen markierte Nukleosidtriphosphate im allgemeinen besonders gut als Substrate von Polymerasen einsetzbar sind und eine anschließende Reaktion mit einem markierten Antikörper gegen das Hapten oder das haptenisierte Nukleosid leicht vorgenommen werden kann. Solche Nukleosidtriphosphate sind beispielsweise Brom-Nukleosidtriphosphate oder Digoxigenin-, Digoxin- oder Fluorescein-gekoppelte Nukleosidtriphosphate. Als besonders geeignet haben sich die in EP-A-0 324 474 genannten Steroide und deren Detektion erwiesen. Für deren Inkorporation in Nukleinsäuren wird hiermit auf die EP-A-0 324 474 verwiesen.

Nukleosidtriphosphate (NTP) sind Ribo (rNTP)- oder Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP).

Unter einer target-Nukleinsäure wird eine Nukleinsäure verstanden, die Ziel des Nachweises und Ausgangsstoff des erfindungsgemäßen Verfahrens ist.

- 7 -

Eine template-Nukleinsäure A ist eine Nukleinsäure, zu der ein im wesentlichen komplementärer Nukleinsäurestrang neu gebildet wird. In Bezug auf die Sequenzinformation dient die template-Nukleinsäure als Matritze und enthält die Sequenzformation, die in Reaktion a) in die Nukleinsäure B umgeschrieben wird. Die Nukleinsäure A ist entweder die target-Nukleinsäure oder eine davon abgeleitete Nukleinsäure. Sie kann beispielsweise ein Teil der target-Nukleinsäure sein oder einen Teil der target-Nukleinsäure neben anderen Teilen enthalten, beispielsweise hochkomplexe Nukleinsäuren. Sie kann auch einen Teil des zu der target-Nukleinsäure komplementären Stranges enthalten.

Denaturierung von Nukleinsäuren bedeutet Auftrennung von Nukleinsäuredoppelsträngen in Einzelstränge. Dem Fachmann stehen eine Vielzahl von Varianten zur Verfügung.

Unter einem spezifischen Nachweis wird ein Verfahren verstanden, durch welches gewünschtenfalls selektiv bestimmte Nukleinsäuren auch in Gegenwart anderer Nukleinsäuren nachgewiesen werden können. Es ist jedoch auch möglich, mehrere Nukleinsäuren oder eine Gruppe von Nukleinsäuren mit teilweise übereinstimmender oder ähnlicher Nukleotidsequenz oder mehrere Abschnitte einer Nukleinsäure in Gegenwart anderer Nukleinsäuren nachzuweisen. Zum Nachweis doppelsträngiger Nukleinsäuren kann jeder der beiden komplementären Stränge einbezogen werden.

Unter einer im wesentlichen komplementären Nukleinsäure oder Nukleinsäuresequenz werden Nukleinsäuren oder Sequenzen verstanden, die mit der entsprechenden Nukleinsäure hybridisieren können, deren Nukleotidsequenz

- 8 -

im hybridisierenden Bereich entweder genau komplementär zu der anderen Nukleinsäure ist oder sich in wenigen Basen von der genau komplementären Nukleinsäure unterscheidet. Die Spezifität richtet sich dabei sowohl nach dem Grad der Komplementarität als auch nach den Hybridisierungsbedingungen.

Flüssige Phasen sind die üblicherweise bei Nukleinsäurenachweisen verwendeten wässrigen Phasen mit gelosten organischen bzw. anorganischen Inhaltsstoffen, z.B. Hybridisierungspuffer, überschüssigen Nukleotiden, weiteren nicht nachzuweisenden Nukleinsäuren, Proteinen etc.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zum Nachweis einer Nukleinsäure. Unter Nukleinsäuren sind hierbei Nukleinsäuren jeglichen Ursprungs zu verstehen, beispielsweise Nukleinsäuren viroiden, viralen, bakteriellen oder zellulären Ursprungs. Sie können in Lösung, Suspension, aber auch an Festkörpern fixiert oder in zellhaltigen Medien, Zellabstrichen, fixierten Zellen, Gewebsschnitten oder fixierten Organismen vorliegen. Bevorzugt liegen die Nukleinsäuren in Lösung vor. Die Reaktionssequenz wird meist gestartet durch Verfügbarmachung der zu untersuchenden Nukleinsäure mit entsprechenden Reagentien. Hierbei können sowohl Veränderungen des pHs (alkalisch), Hitze, Wiederholung extremer Temperaturveränderungen (Einfrieren/Auftauen), Veränderung der physiologischen Wachstumsbedingungen (Osmotischer Druck), Einwirkung von Detergentien, chaotropen Salzen oder Enzymen (z.B. Proteasen, Lipasen), alleine oder in Kombination zur Freisetzung der Nukleinsäuren beitragen. Da das erfindungsgemäße Verfahren sehr empfindlich und selektiv ist, können auch kleine Nukleinsäuremengen in Anwesenheit anderer Stoffe,

- 9 -

beispielsweise Proteinen, Zellen, Zellfragmenten, aber auch nicht nachzuweisender Nukleinsäuren nachgewiesen werden. Eine Aufreinigung von Proben kann somit entfallen, wenn sichergestellt ist, daß die nachzuweisenden Nukleinsäuren für die eingesetzten Reagenzien ausreichend zugänglich sind.

Die Nukleinsäuren können auch vorbehandelt sein. Zu den bekannten Vorbehandlungen gehört insbesondere die Fragmentierung, beispielsweise mittels Restriktionsenzymen oder die cDNS-Synthese aus RNS. Damit das erfindungsgemäße Verfahren seine Vorteile voll entfalten kann, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, wenn die Nukleinsäure eine Größe von mindestens 40 bp aufweist.

Weiterhin ist die Nukleinsäure bevorzugt das Produkt einer vorgeschalteten spezifischen oder unspezifischen Nukleinsäurevermehrung. Solche Nukleinsäureamplifikationsverfahren sind beispielsweise aus

EP-A-0 201 184, EP-A-0 272 098, DE-A-37 26 934,  
EP-A-0 237 362, WO 88/10315, WO 90/01069, WO 87/06270,  
EP-A-0 300 796, EP-A-0 310 229, WO 89/09835,  
EP-A-0 370 694, EP-A-0 356 021, EP-A-0 373 960,  
EP-A-0 379 369, WO 89/12696 oder EP-A-0 361 983

bekannt. Die Nukleinsäure kann jedoch auch eine durch Klonierung und in-vivo-Vermehrung hergestellte Nukleinsäure sein.

Die nachzuweisenden (target-)Nukleinsäuren können direkt als template-Nukleinsäuren A in Reaktion a) eingesetzt werden, wenn sie die für das gewählte Enzymsystem erforderlichen Bedingungen erfüllen. Dazu gehört für

- 10 -

manche Enzyme, daß es sich um einzelsträngige Nukleinsäuren handelt, bei anderen ist es erforderlich, daß sie Erkennungsstellen bzw. Promotoren für das Enzymsystem beinhalten.

Ist dies nicht der Fall, so müssen die target-Nukleinsäuren in einem (Reaktion a) vorgeschalteten Schritt in derartige template-Nukleinsäuren A überführt werden.

Es kann sich bei A um eine Ribonukleinsäure oder eine Desoxyribonukleinsäure handeln. Besonders bevorzugt als Nukleinsäure A sind Desoxyribonukleinsäuren.

Das Enzym E im Sinne der Erfindung ist ein Enzym oder Enzymsystem, das die templatabhängige Synthese von Nukleinsäuren aus Mononukleosidtriphosphaten katalysiert. Bevorzugte Enzyme sind Polymerasen und Transskriptasen, die die Verknüpfung von Mononukleotiden bewirken. Solche Enzyme sind dem Fachmann bekannt.

In einem ersten Schritt wird aus der template-Nukleinsäure A eine markierte Nukleinsäure B hergestellt. Dies kann auf prinzipiell jede Art und Weise geschehen, solange nur die spezifische Information der Nukleotidsequenz der Nukleinsäure A oder eines Teils davon im wesentlichen erhalten bleibt.

Eine Methode ist beispielsweise der Austausch von einzelnen Nukleotiden der Nukleinsäure A gegen markierte Nukleotide, beispielsweise durch Nick-Reparatur (J. Mol. Biol. 113, 237 (1977)). Das Enzym E bei dieser Reaktion ist E. coli DNA Polymerase oder Kornberg-Enzym. Dieses Verfahren ist jedoch nicht allzu vorteilhaft, da die Markierung relativ unspezifisch eingeführt wird, d.h.

- 11 -

neben der Nukleinsäure A alle weiteren in der Probe vorliegenden Nukleinsäuren markiert werden. Es eignet sich daher für Reaktion a) insbesondere dann, wenn, wie oben geschildert, in einer vorgeschalteten Vermehrungsreaktion die nachzuweisenden Nukleinsäuren spezifisch amplifiziert wurden.

In einer anderen Methode, welche ebenfalls den genannten Nachteil aufweist, wird die Nukleinsäure A unter Einbau von markierten Nukleotiden verlängert (tailing). Weitere Verfahren dieser Art sind Photomarkierung und Random Priming.

Bei den bisher geschilderten Schritten zur Herstellung der Nukleinsäure B wird in Reaktion A direkt die target-Nukleinsäure eingesetzt. Diese kann einzel- oder doppelsträngig vorliegen.

Die target-Nukleinsäuren der im folgenden aufgeführten bevorzugten Ausführungsvarianten müssen vor oder während der Reaktion a) einzelsträngig gemacht werden. Eine evtl. notwendige Strangtrennung kann durch Behandlung mit Alkali, aber auch thermisch, enzymatisch oder mittels chaotroper Salze geschehen.

Die Verwendung von Reaktionen a), die von der Anwesenheit eines spezifischen Starters abhängig sind, ist wegen der erhöhten Spezifität besonders bevorzugt. Solche spezifischen Starter bewirken, daß das Enzym nur auf die Nukleinsäure wirkt, welche diesen Starter gebunden hat. Der Starter ist bevorzugt ein sogenannter spezifischer Primer P1, ein Promotor oder eine Replikationsinitiationsregion.

- 12 -

Spezifische Primer P1 sind besonders Oligonukleotide oder modifizierte Oligonukleotide, die eine im wesentlichen zu der Nukleinsäure A komplementäre Nukleotidsequenz aufweisen. Modifizierte Oligonukleotide sind beispielsweise Oligonukleotide, die am 3'-Ende ein Dideoxynukleotid enthalten. Solche Oligonukleotide können enzymatisch hergestellt werden. Als template-Nukleinsäure A kann direkt die target-Nukleinsäure eingesetzt werden.

Die Verwendung solcher Primer P1 setzt also voraus, daß zumindest ein Teil der Sequenz der Nukleinsäure bekannt ist. Die Sequenz des Primers wird ferner so gewählt, daß er an einem seiner Enden, bevorzugt am 3'-Ende, kürzer ist als die Nukleinsäure. Diese weist daher über das 3'-Ende des Primers hinaus ein überstehendes einzelsträngiges Teilstück auf.

In den Reaktionsschritt können pro nachzuweisendem Nukleinsäureeinzelstrang ein oder mehrere spezifische Primer eingesetzt werden. Im Fall mehrerer Primer überlappen sich die Bereiche auf der Nukleinsäure, mit denen die Primer hybridisieren können, bevorzugt nicht, und besonders bevorzugt liegen zwischen diesen Bereichen einzelsträngige Bereiche der Nukleinsäure A. Der Primer kann neben einem zu der template-Nukleinsäure A im wesentlichen komplementären Teil, bevorzugt am 5'-Ende, auch noch eine Nukleotidsequenz S1 beinhalten, die nicht mit der Nukleinsäure, insbesondere in dem an den komplementären Bereich anschließenden Bereich, hybridisieren kann.

Diese Sequenz S1 kann beispielsweise einzel- oder doppelsträngig sein und auch eine Erkennungssequenz für ein Enzym enthalten. Dies kann z.B. eine Restriktionsschnittstelle sein. Auch kann der Primer im

- 13 -

Hinblick auf effektives Priming beispielsweise ein Protein gebunden enthalten, welches von einem Enzym E, vorzugsweise einer Polymerase, erkannt wird.

Damit die Reaktion a) ablaufen kann, müssen die Nukleinsäure A und der Primer P1 im komplementären Bereich zunächst jeweils von gegebenenfalls anwesenden Komplementärsträngen getrennt werden. Diese Trennung kann nach bekannten Methoden, beispielsweise thermisch oder nichtthermisch erfolgen. Die nichtthermische Denaturierung ist bevorzugt. Reaktion a) wird dann unter Bedingungen gestartet, bei denen A und P1 miteinander hybridisieren können.

Bei Verwendung eines Primers als Starter wird der Probe außerdem ein Enzym E zugegeben, welches in einer primerabhängigen Reaktion zu A komplementäre Nukleinsäure synthetisieren kann. Dazu gehören insbesondere Polymerasen. Ihre Substratspezifität richtet sich nach der Nukleinsäure A. Ist A RNS, so kommen insbesondere RNS-abhängige DNS-Polymerasen, wie reverse Transkriptase (z.B. aus AMV oder M-MuLV) in Frage. Ist A DNS, so sind DNS-abhängige DNS-Polymerasen, wie Klenow-Enzym der Taq-DNS-Polymerase bevorzugt.

Ebenfalls der Probe zugegeben werden Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP), von denen mindestens eines markiert ist.

Produkt der Polymerasereaktion ist eine markierte Desoxyribonukleinsäure B, in welche der Primer P1 sowie das markierte Desoxyribonukleosidtriphosphat eingebaut

- 14 -

sind. Diese Nukleinsäure B ist gleich groß oder kleiner als das template, weist jedoch einen Bereich auf, der zu mindestens einem Teil im wesentlichen komplementär zum template ist.

Diese Nukleinsäure B kann nun direkt in Schritt b) eingesetzt werden. Vorteilhaft wird sie jedoch nochmals als template-Nukleinsäure einer Reaktion analog zu Schritt a) unterworfen. Hierzu wird der Probe ein Primer P2 zugesetzt, der im wesentlichen komplementär zu einem Teil der Nukleinsäure B, bevorzugt zu einem Teil des neu aus dNTPs gebildeten Bereiches, ist. Das Primerpaar P1 und P2 erfüllen bevorzugt die in EP-A-0 201 184 geschilderten Bedingungen. Bevorzugt werden P1 und P2 gleichzeitig zu dem template A zugegeben.

Um eine noch höhere Empfindlichkeit zu erlangen, ist es möglich, Reaktion a) noch mehrere Male, bevorzugt 1-60, besonders bevorzugt 20-60 mal, durchzuführen, wobei jeweils die Produkte der Reaktion erneut in Reaktion a) eingesetzt werden. Dadurch ergibt sich theoretisch eine nahezu exponentielle Vermehrung an markierten Nukleinsäuren. Es werden dabei beide Nukleinsäurestränge gebildet, wobei die Länge durch die nicht verlängerbaren Enden der Primer P1 und P2 festgelegt ist. Es ist analog zu EP-A-0 201 184 möglich, in den späteren Durchläufen von Reaktion a) auch sogenannte nested Primer zu verwenden, deren Sequenz so gewählt ist, daß die entstehenden Nukleinsäuren kleiner sind als die zunächst gebildeten. Vor jedem Durchlauf von Reaktion a) ist es zweckmäßig, die in Reaktion a) gebildeten Doppelstränge aus A und B zu trennen. Dies kann thermisch oder nicht thermisch geschehen. Es müssen jeweils erneut Primer P1 und P2 anwesend sein.

Der Starter kann auch ein Promotor sein. Ein Promotor ist eine Nukleotidsequenz, die von einer RNS-Polymerase erkannt wird und diese veranlaßt, einen zu der auf den Promotor folgenden Nukleotidsequenz komplementären Nukleinsäurestrang B zu synthetisieren. Dabei wird neben den nicht markierten NTPs auch das markierte NTP in den gebildeten Nukleinsäurestrang eingebaut.

Geeignete Promotoren sind bekannt, beispielsweise RNS-Polymerase-Bindungsstellen aus Bakteriophagen wie T3, T7 oder SP6 (Melton et al.: NAR 12, 1984, 7035-56; Pfeiffer & Gilbert: Protein Sequences and DNA-Analysis I, 1988, 269-280; Uhlenbeck et al.: Nature 328, 1987, 596-600).

Der Promotor ist in einer bevorzugten Ausführungsform des Nachweisverfahrens Teil eines spezifischen Primers zur Herstellung der template-Nukleinsäure A aus der target-Nukleinsäure. Dieser Primer hat eine Nukleotidsequenz S1, die im wesentlichen komplementär zu einem Teil der target-Nukleinsäure ist, und eine Nukleotidsequenz S2, die von einer RNS-Polymerase erkannt wird und mindestens eine Promotor-sequenz beinhaltet. In einer ersten Reaktion wird mit dem Primer und einer von der Art der target-Nukleinsäure abhängigen DNS-Polymerase und dNTPs ein zu der target-Nukleinsäure mindestens teilweise komplementärer Nukleinsäurestrang A1 gebildet, der den Primer mit dem Promotor beinhaltet. Falls nicht bereits mit dem Primer verbunden, wird das neu gebildete Nukleinsäurestück durch Zugabe eines weiteren Enzyms, bevorzugt einer Ligase, z.B. E.coli-DNS-Ligase mit dem Primer kovalent verknüpft. Die Ligase kann auch thermisch stabil sein. A1 ist bevorzugt kürzer als die target-Nukleinsäure.

- 16 -

Bevorzugt wird in dieser Transkriptionsreaktion ein zweiter zum target-Nukleinsäurestrang komplementärer Primer P3 eingesetzt und die Lücke zwischen beiden Primern geschlossen, beispielsweise durch eine Gap-Filling-Reaktion. Der Einsatz markierter dNTPs ist hier noch nicht erforderlich, da sich diese Maßnahme im erfindungsgemäßen Verfahren in einer nur geringen Verstärkung des Meßsignals auswirkt, aber möglich.

Ist die target-Nukleinsäure RNS, so wird diese bevorzugt in einem folgenden Schritt selektiv abgebaut. Dazu sind bekannte Verfahren geeignet, beispielsweise die Behandlung mit Alkali oder mit RNAsen. Anschließend wird ein zu A1 komplementärer Nukleinsäurestrang A2 gebildet. Dazu wird der Reaktionsmischung ein Primer P2 zugesetzt, der zu einem Teil, bevorzugt einem neu gebildeten Teil des Stranges A1 komplementär ist. Bevorzugt enthält der Primer P2 ebenfalls die Promotorsequenz S2. Dieser wird, wie oben bei A1 beschrieben zu A2 verlängert. Solche Verfahrensschritte sind z.B. in der EP-A-0 329 822, DE-A-37 26 934, WO 88/10315, WO 87/06270, EP-A-0 310 229 und EP-A-0 373 960 beschrieben, weshalb hier auf diese Offenbarungen vollinhaltlich Bezug genommen wird. Insbesondere in Bezug auf Details, die zur reversen Transkription von RNS oder Transkription von DNS hilfreich und erforderlich sind, wird auf diese Offenbarung verwiesen.

Besonders bevorzugt enthält die Probe bei dieser Ausführungsform außerdem den zu der target-Nukleinsäure komplementären Strang, wobei P1 und P2 gleichzeitig verlängert werden.

- 17 -

Bei der genannten Ausführungsform wird der so vorbehandelten Probe anschließend erfindungsgemäß eine Promotor-spezifisch gesteuerte DNS-abhängige RNS-Polymerase eingesetzt. Solche Polymerasen sind z.B. T3, T7 oder SP6 RNS-Polymerase. Mit ihrer Hilfe werden aus NTPs und dem markierten NTP markierte Nukleinsäuren B gebildet. Die doppelsträngige Nukleinsäure A1/A2 dient dabei als template-Nukleinsäure, bevorzugt mehrmals.

Bevorzugte NTPs sind Ribonukleosidtriphosphate. Da bei dieser Variante der Reaktion a) einzelsträngige Nukleinsäuren B gebildet werden, ist eine Denaturierung zur Strangtrennung nicht unbedingt erforderlich, aber möglich.

Eine bevorzugte Ausführungsform ist das Vorgehen nach DE-A-4010465, jedoch unter Verwendung nachweisbar markierter Ribonukleosidtriphosphate.

Der Starter ist bevorzugt eine Replikationsinitiationsregion (RIR). Eine Replikationsinitiationsregion ist beispielsweise eine Nukleotidsequenz, die von einem Replikationsenzym bzw. -enzymkomplex, beispielsweise einer DNS-abhängigen DNS-Polymerase, wie von  $\phi$  29 (P2, P3) erkannt wird. Besonders bevorzugt ist der Fall, daß die RIR ein Teil eines spezifischen Primers ist. Dieser Primer hat eine Nukleotidsequenz S1, die im wesentlichen komplementär ist zu einem Teil der target-Nukleinsäure und daran anschließend eine Sequenz S2, welche eine Erkennungsstelle, bevorzugt Proteine, für einen Replikationskomplex, aufweist. Ein solcher Primer wird im folgenden Adaptor Ad genannt. Die Reaktion wird eingeleitet, indem die target-Nukleinsäure, welche die eigentlich nachzuweisende Spezies ist, mit Ad unter

- 18 -

Hybridisierungsbedingungen umgesetzt wird. Besonders bevorzugt ist der Einsatz von zwei Adaptoren Ad1 und Ad2 pro target-Nukleinsäureeinzelstrang, wobei die targetspezifischen Sequenzen mit voneinander räumlich getrennten Sequenzen der einzelsträngigen target-Nukleinsäure hybridisieren können und die targetspezifischen Sequenzen des Adaptoren auf der target-Nukleinsäure aufeinander zu gerichtet sind.

Die einzelsträngige Lücke zwischen den Adaptoren wird durch eine gap-filling Reaktion (Maniatis et al., Molecular Cloning, 1982, CSH) aufgefüllt. Der Einsatz von markierten NTPs ist nicht erforderlich, aber möglich. Dadurch entsteht ein Nukleinsäuredoppelstrang, welcher einen Strang der target-Nukleinsäure und einen Strang der neugebildeten Nukleinsäure A enthält. Dieser enthält mindestens eine, bevorzugt 2 Replikationsinitiationsregionen, welche besonders bevorzugt in entgegengesetzter Replikationsrichtung angeordnet sind.

Aus diesem Doppelstrang kann nun auf erfindungsgemäße Weise durch Replikation ohne weiteren Zusatz von Adaptoren unter Verwendung von markierten und unmarkierten Nukleosidtriphosphaten in Reaktion a) eine markierte Nukleinsäure B hergestellt werden. Diese enthält wiederum mindestens eine, bevorzugt 2, Replikationsinitiationsregionen und kann daher erneut in Reaktion a) als template-Nukleinsäure eingesetzt werden. Somit wird eine erhebliche Vermehrung von B erreicht. Für den Fall, daß beide Adaptoren je eine RIR aufweisen, oder zwei zueinander komplementäre Nukleinsäuren A in Reaktion a) eingesetzt werden, können zwei zueinander komplementäre Nukleinsäuren B entstehen. Diese müssen vor Schritt b) voneinander durch Denaturierung getrennt werden.

- 19 -

Nach Schritt a) wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren die Reaktionsmischung einer nichtthermischen Denaturierung (Reaktion e)) unterzogen. Auch falls Schritt a) mehrfach durchgeführt wird, findet die nichtthermische Denaturierung direkt vor Schritt b) statt. Insbesondere werden dabei Nukleinsäuredoppelstränge voneinander getrennt. Nichtthermische Denaturierung bedeutet, daß die Temperatur zur Denaturierung nicht über 50°C, bevorzugt nicht über 37°C, bevorzugt in einem Bereich zwischen 22 und 37°C stattfindet. Bei der Denaturierung werden eventuell vorliegende Nukleinsäuredoppelstränge voneinander getrennt, sodaß Nukleinsäure B als Einzelstrang vorliegt. Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Stringenz geschehen aber auch durch Enzyme, beispielsweise Helicase, recA-Protein, E.coli ssb-Protein, Gen-32-Protein, und durch Alkali oder durch Zusatz von doppelstrangstabilisierenden Chemikalien, wie z.B. organischen Substanzen, wie Harnstoff, Formamid (Konzentration > 70%, NAR 1977, Vol. 4, 5, 1539-1553) oder chaotropen Salzen. Chaotropen Salze sind in J. Biol. Chem. 1966, 241/17, 4030-4042 J. Amer. Chem. Soc. USA 1962, 84/8, 1329-1338 oder Anal. Biochem. 129, 357-364 (1983) beschrieben. Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind NaJ, Guanidiniumthiocyanat oder NaClO<sub>4</sub>. Die zur Denaturierung erforderliche Konzentration dieser Salze kann durch einfache Versuche ermittelt werden. Sie beträgt jedoch z.B. für NaJ bevorzugt ca. 12.2 mol/l, für Guanidiniumsalze ca. 4 mol/l und für NaClO<sub>4</sub> ca. 7 mol/l.

Als besonders vorteilhaft hat sich hier die alkalische Denaturierung erwiesen. Dazu wird die Reaktionsmischung aus Reaktion a) auf einen pH im Bereich von 10 bis 14, bevorzugt von 12 bis 14, gebracht. Dies kann beispielsweise durch Zugabe einer Lösung von NaOH oder KOH in Wasser geschehen.

- 20 -

Die Temperatur der Mischung liegt während der Inkubation von 1 bis 30 min bevorzugt von 5 bis 10 min, in einem Bereich von 17 bis 50°C, bevorzugt von 22 bis 37°C.

Im folgenden Reaktionsschritt b) wird Nukleinsäure B mit der Sonde C so zur Reaktion gebracht, daß sie zusammen ein Nukleinsäurehybrid D bilden.

Als Nukleinsäuresonde C kommen insbesondere Oligo- bzw. Poly-Nukleotide mit einer Länge von 6 bis 5000, bevorzugt 15 bis 2000 in Frage. Die Sonde C kann ein Plasmid, ein Nukleinsäurefragment oder ein Oligonukleotid sein. Es kann sich um RNS oder DNS handeln. Nukleinsäuresonde C wird im Überschuß zu der erwarteten Menge an Nukleinsäure B zu der Reaktionsmischung vorteilhaft in Form einer wässrigen Lösung zugegeben. Die Sonde C weist eine Nukleotidsequenz auf, die im wesentlichen komplementär zu B ist, und die für B spezifisch ist, also nicht oder nur in sehr geringem Umfang mit in der Probe vorhandenen oder neu gebildeten Nukleinsäuren hybridisiert, die nicht nachgewiesen werden sollen. Durch die Kombination der Verwendung spezifischer Primer und der Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde wird das erfindungsgemäße Verfahren besonders selektiv.

C kann eine doppelsträngige Nukleinsäure sein, deren einer Strang C1 komplementär zu einem Teil von B ist. Bevorzugt ist der andere Strang C2 der Nukleinsäuresonde zu anderen Nukleinsäuren B komplementär, insbesondere zu solchen, die bei Durchführung von Reaktion a) mit B als template-Nukleinsäure entstehen. Die Denaturierung von C kann dabei separat von B vorgenommen werden. Es ist jedoch bevorzugt, C zusammen mit B zu denaturieren. Dies gilt insbesondere für die alkalische Denaturierung. Dazu wird C bevorzugt

vor der Alkalisierung der Reaktionsmischung aus a) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit wird die Mischung auf einen pH von 5.0 bis 8.5, bevorzugt 7-8, gebracht, worauf sich die Nukleinsäurehybride D aus B und C1 bzw. C2 bilden.

Bevorzugt ist der Fall, daß es sich bei C um eine einzelsträngige Nukleinsäuresonde C1 handelt und der zu C1 komplementäre Strang C2 nicht zugesetzt wird. Zwar ist es dann auch möglich, C1 vor Denaturierung von B zuzugeben. Besonders bevorzugt ist dann jedoch im Fall der alkalischen Denaturierung von B, zuerst nur B alkalisch zu inkubieren und danach eine saure Lösung der Sonde C1 zuzusetzen. Der pH der sauren Lösung von C1 liegt in einem Bereich von 3.0 bis 6.5, bevorzugt 4.5 bis 6.0, ohne daß eine merkliche Instabilität der Sonde festzustellen ist. Die schwach saure Lösung sollte nach Zugabe zur Hybridisierungslösung zur Einstellung eines pH von 5.0 bis 8.0 ausreichen. Die Lösung kann auch in diesem Bereich gepuffert sein und weitere zur Hybridisierung hilfreiche Reagenzien enthalten, wie z.B. SSC, Formamid oder Blockierungsreagenzien für nicht nachzuweisende Nukleinsäuren. Der pH der Mischung nach Zugabe von C1 sollte auch hier im Bereich von 5.0 bis 8.5 liegen. Die Feinregulierung des pHs kann beispielsweise durch die Menge an Hybridisierungslösung sowie deren pH vorgenommen werden.

Säuren, die zur Neutralisation bzw. als Bestandteil der Hybridisierungslösung verwendet werden können, sind beispielsweise Salzsäure oder Ameisensäure; bevorzugt sind jedoch Essigsäure oder Phosphorsäure. Der pH der Hybridisierungslösung vor Zugabe zur Probe liegt zwischen

3.0 und 6.5. Die Konzentration am Beispiel der Essigsäure liegt bevorzugt zwischen 0.05 und 0.5 mol/l, besonders bevorzugt 0.1 und 0.2 mol/l.

Einzelsträngige Nukleinsäuresonden Cl können beispielsweise durch chemische Nukleinsäuresynthese gemäß DE-A- 39 16 871 oder auch gemäß EP-B-0 184 056 hergestellt werden.

Diese Ausführungsform hat den Vorteil, daß durch Verwendung der Sondenlösung zur Neutralisation der Probenlösung ein Pipettierschritt eingespart werden kann. Außerdem hat es sich erwiesen, daß die Zugabe einer konzentrierten Säure zu der alkalibehandelten Probe mit hohem Proteingehalt zu Verklumpungen führt, weshalb die vorgeschlagene Vorgehensweise besonders vorteilhaft ist.

Falls vor Schritt b) eine Denaturierung mittels doppelstrangdestabilisierenden Substanzen vorgenommen wurde, können Bedingungen für die Hybridisierung mit der Sonde C eingestellt werden, indem das Gemisch verdünnt wird.

Sonde C enthält pro Nukleinsäurestrang eine oder mehr zur Immobilisierung befähigende (immobilisierbare) Gruppen I.

Zur Immobilisierung befähigende Gruppen I sind beispielsweise chemische Gruppen, die kovalent, beispielsweise über eine chemische oder eine Photoreaktion an eine feste Phase gebunden werden können, oder Gruppen bzw. Molekülteile, die über gruppenspezifische Wechselwirkungen von einem anderen Molekül oder Molekülteil erkannt und gebunden werden können. Solche Gruppen sind daher z. B. Haptene, Antigene und Antikörper,

- 23 -

Nukleotidsequenzen, Rezeptoren, Regulationssequenzen, Glykoproteine, beispielsweise Lectine, oder auch die Bindungspartner von Bindeproteinen, wie Biotin oder Iminobiotin. Bevorzugt sind Vitamine und Haptene, besonders bevorzugt sind Biotin, Fluorescein oder Steroide, wie Digoxigenin oder Digoxin. Für die Erfindung ist es wichtig, daß in jedem Hybrid D die immobilisierbare Gruppe der Sonde sich von der nachweisbaren Gruppe der Nukleinsäure B unterscheidet.

Die Mischung, welche das Nukleinsäurehybrid D enthält, wenn die nachzuweisende Nukleinsäure in der Probe vorhanden war, wird anschließend mit einer festen Phase F in Kontakt gebracht, welche das Hybrid D über die immobilisierbaren Gruppen der Nukleinsäuresonde C spezifisch binden kann.

Die Art der Festphase richtet sich nach der zur Immobilisierung befähigenden Gruppe I. Bevorzugt weist sie eine immobilisierende Gruppe R auf, die eine bindende Wechselwirkung mit I eingehen kann. Ist die immobilisierbare Gruppe beispielsweise ein Hapten, dann kann eine Festphase verwendet werden, die an ihrer Oberfläche Antikörper gegen dieses Hapten aufweist. Ist die immobilisierbare Gruppe ein Vitamin, wie z. B. Biotin, dann kann die Festphase bindende Proteine, wie Avidin oder Streptavidin immobilisiert enthalten. Besonders bevorzugte Reste I und R sind Biotin und Streptavidin. Die Immobilisierung über eine Gruppe an der modifizierten Nukleinsäure ist besonders vorteilhaft, da sie unter mildereren Bedingungen stattfinden kann als beispielsweise Hybridisierungsreaktionen.

Bevorzugt wird zur Immobilisierung der gebildeten Nukleinsäuren die Reaktionsmischung nach Bildung der Nukleinsäurehybride D in ein Gefäß gefüllt, welches an seiner Oberfläche mit der immobilisierbaren Gruppe reagieren kann. Bevorzugt findet die Hybridisierungsreaktion mit der Sonde gleichzeitig mit der Immobilisierung statt. Das Gefäß kann beispielsweise eine Küvette, ein Röhrchen oder eine Mikrotiterplatte sein. Es ist jedoch auch möglich, eine Festphase in Form eines porösen Materials, wie einer Membran, eines Gewebes oder eines Vlieses, zu verwenden, auf welche die Reaktionsmischung aufgegeben wird. Ebenso ist die Verwendung von Perlen, sogenannten beads, oder Latex-Partikeln möglich. Die feste Phase sollte mindestens soviele Bindungsstellen für die immobilisierbare Gruppe der Sonde haben, wie Nukleinsäurehybride D und damit Nukleinsäuren B vorhanden sind.

Die Herstellung einer bevorzugten festen Phase ist in der EP-A-0 344 578 beschrieben, auf welche vollinhaltlich Bezug genommen wird.

Nach einer Inkubationszeit, während der die Immobilisierungsreaktion stattfindet, wird die flüssige Phase aus dem Gefäß, dem porösen Material oder den pelletierten beads entfernt. Die Festphase kann anschließend mit einem geeigneten Puffer gewaschen werden, da die Bindung der Hybride D an der Festphase sehr effizient ist. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt dabei die Verwendung besonders weniger Waschschritte, da die schwer abtrennbaren Sonden im Gegensatz zu im Stand der Technik verwendeten detektierbaren Sonden nicht unbedingt vollständig entfernt werden müssen, oder führt zu vergleichsweise geringen Hintergrundsignalen.

Die Menge der an die Festphase gebundenen modifizierten Nukleinsäuren kann auf im Prinzip bekannte Weise bestimmt werden, wobei sich die durchzuführenden Schritte nach der Art der nachweisbaren Gruppe richten. Bei direkt nachweisbaren Gruppen, beispielsweise Fluoreszenzlabeln, wird die Menge an Label fluorometrisch bestimmt. Ist die nachweisbare Gruppe ein Hapten, so wird die modifizierte Nukleinsäure bevorzugt mit einem markierten Antikörper gegen das Hapten umgesetzt, wie analog in der EP-A-0324474 beschrieben. Die Markierung kann beispielsweise eine Enzymmarkierung, wie  $\beta$ -Galaktosidase, alkalische Phosphatase oder Peroxidase sein. Im Fall der Enzymmarkierung wird die Menge an Nukleinsäure über die meist photometrische, chemoluminometrische oder fluorometrische Verfolgung einer Reaktion des Enzyms mit einem chromogenen, chemoluminogenen oder fluorogenen Substrat gemessen. Es ist jedoch auch elektrochemische Verfolgung der Reaktion möglich, wenn ein Redoxenzym als Markierung verwendet wird, oder die Verfolgung einer pH-Wertänderung mittels einer pH-Elektrode. Das Meßsignal ist ein Maß für die Menge an ursprünglich vorhandener target-Nukleinsäure.

Der Nachweis der Nukleinsäure kann sowohl qualitativ als auch quantitativ geführt werden. Im Falle einer quantitativen Auswertung hat es sich als zweckmäßig herausgestellt, mindestens einen Vergleichsversuch mit einer Probe bekannten Nukleinsäuregehalts durchzuführen. Die Erstellung einer Eichkurve ist möglich und empfehlenswert.

In einer Ausführungsform des Verfahrens unter Verwendung der PCR werden der Probe als Primer P1 und P2 Oligonukleotide zugegeben. P1 ist hierbei komplementär zu einem Teil des Nukleinsäureeinzelstrangs A, welcher die target- und gleichzeitig die template-Nukleinsäure darstellt. P2 ist homolog zu einem davon entfernten Teil von A. Das Gemisch wird nun, wie in EP-A-0 201 184 beschrieben, behandelt, wobei jedoch neben den unmodifizierten Desoxymononukleotidtriphosphaten auch ein digoxigeninmarkiertes oder fluoresceinmarkiertes Desoxymononukleotidtriphosphat eingesetzt wird. Es werden bevorzugt 20-30 Amplifikationszyklen durchgeführt. Danach werden doppelsträngige biotinmarkierte Sonde C und Natronlauge zu einem pH von 10-14 zugegeben. Die Mischung wird bei ca 37°C inkubiert und anschließend mit einer Lösung von Hybridisierungshilfsstoffen bei ca. pH 5 versetzt, sodaß sich ein pH von ca. 7-8.5 ergibt. Die Mischung wird in ein Streptavidin-beschichtetes Gefäß umgefüllt und erneut inkubiert. Die Lösung wird entfernt und das Gefäß gewaschen. Es wird ein Konjugat aus Antikörper gegen Digoxigenin und einem Enzym zugegeben und erneut inkubiert. Nach Entfernen der Lösung und Waschen des Gefäßes wird mit einem chromogenen Substrat des Enzyms umgesetzt und die Farbbildung beobachtet.

Eine bevorzugte Ausführungsform ist eine Variante des in DE-A-39 29 030 beschriebenen Replikationsverfahrens. Auf die Offenbarung der DE-A-39 29 030 wird hiermit vollinhaltlich Bezug genommen. Zur Durchführung des Verfahrens wird die Probe, welche die einzelsträngige target-Nukleinsäure enthält, mit zwei Adaptoren, die zu dem gleichen Strang komplementär sind und deren mit A hybridisierenden Enden aufeinander zu gerichtet sind und deren nicht hybridisierenden Enden eine Replikationsinitiationssequenz für  $\phi$  29-Polymerase

enthalten, versetzt. Unter Hybridisierungsbedingungen wird die zwischen den Adaptoren befindliche Lücke durch gap-filling mittels DNA-Polymerase oder reverse Transskriptase (als Enzym E1) und Ligase-Reaktion geschlossen. Die hierbei verwendeten Desoxy-mononukleosidtriphosphate können unmodifiziert sein, aber bevorzugt jedoch ist eines von ihnen ein digoxigeninmarkiertes Monodesoxyribonukleosidtriphosphat. Zur Durchführung der Replikation wird das Replikationssystem von  $\phi$  29 (P2, P3 und ATP) sowie neben unmodifizierten Mononukleosidtriphosphaten, falls nicht schon bei der gap-filling-Reaktion verwendet, ein digoxigenin- oder fluorescein-markiertes Monodesoxyribonukleo-sidtriphosphat zugegeben. Die durch Replikation gebildeten nachweisbar markierten Nukleinsäuren B dienen ohne weitere Zugabe von Adaptoren erneut als template-Nukleinsäuren zur Bildung weiterer Nukleinsäuren B. Daher kommt es mit der Zeit theoretisch zu einer exponentiellen Vermehrung der nachweisbar markierten Nukleinsäuren B. Sobald genügend Nukleinsäuren entstanden sind, wird die Mischung einem nicht-thermischen Denaturierungsschritt unterzogen und mit einer bevorzugt einzelsträngigen biotinmarkierten Sonde C1 in einer Lösung mit Hybridisierungsreagenzien bei pH 3.0-6.5 bis zu einem pH von 5.0-8.5 bevorzugt 7.0-8.0 versetzt. Durch Einführung des nichtthermischen Denaturierungsschritts wird es möglich, das gesamte Nachweisverfahren in einem Temperaturbereich zwischen 17 und 50°C und bevorzugt bei einer einzigen Temperatur durchzuführen. Die Mischung wird in ein streptavidin-beschichtetes Gefäß umgefüllt und inkubiert. Nach Absaugen der Flüssigkeit und Waschen des Gefäßes wird eine Lösung eines Konjugats aus einem enzymmarkierten Antikörper gegen Digoxigenin bzw. Fluorescein zugegeben und wieder

inkubiert. Nach Absaugen der Lösung und Waschen wird mit einer Lösung eines chromogenen Substrats versetzt und die Farbbildung beobachtet.

In den Verfahren des Standes der Technik wurden bisher immer nachweisbar markierte Sonden eingesetzt. Eine vollständige Abtrennung der nicht hybridisierenden Sonden war für die Genauigkeit des Meßergebnisses erforderlich, jedoch relativ aufwendig.

Das erfindungsgemäße Verfahren umgeht diesen Nachteil, indem anstelle der Hybridisierung von markierten Sonden und deren Bestimmung die Anwesenheit eingebauter markierter Mononukleotide gemessen und als Maß für die Anwesenheit bzw. die Menge an nachzuweisenden Nukleinsäuren genommen wird. Die Abtrennung nicht eingebauter markierter Mononukleotide ist nach dem vorliegenden Verfahren besonders einfach und vollständig zu erreichen, da sie weder an die Nukleinsäuren noch an die Oberfläche gebunden werden. Ein Überschuß an immobilisierbarer Sonde C hingegen stört die Bestimmung nicht, da die immobilisierbaren Gruppen von Sonde C nicht als Markierung verwendet werden und somit nicht zum Meßergebnis beitragen. Insbesondere ist die Bindekapazität der festen Phase besser kalkulierbar als beim Einbau von immobilisierbaren NTPs.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist daher sehr sensitiv und selektiv, außerdem kann es in kurzer Zeit durchgeführt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zum Nachweis von Nukleinsäuren als solchen, von nukleinsäurehaltigen Organismen z.B. Bakterien, Viren und Zellen und zum Nachweis von Nukleinsäureveränderungen, wie Mutationen

oder Chromosomentranslokationen und zur Lokalisierung und zum Expressionsgrad von Genen. Sowohl Ribonukleinsäuren als auch Desoxyribonukleinsäuren können nachgewiesen werden. Auch die Identifizierung von punktuellen Unterschieden in Nukleinsäuren ist möglich, wenn die Ergebnisse von Experimenten verglichen werden, in denen in Reaktion a) einmal ein Primer eingesetzt wird, der an einem 3'-Ende zu der Nukleinsäure A komplementär ist, zum anderen ein Primer eingesetzt wird, der an seinem 3'-Ende gerade nicht zu Nukleinsäure A komplementär ist, aber dennoch mit ihr hybridisiert. Eine Verlängerung des Primers und damit Bildung der Nukleinsäure B wird nur im ersten Fall möglich sein. Die Auswahl solcher Primer ist beispielsweise in PNAS 86, 2757 (1980) beschrieben.

Figur 1 zeigt schematisch den Ablauf einer Ausführungsform unter Verwendung einer Primerelongation (Verwendung nur eines Primers P1).

Figur 2 zeigt schematisch den Ablauf einer Ausführungsform unter Verwendung des PCR-Prinzips mit zwei Primern, wobei die zunächst gebildeten Nukleinsäuren B erneut als template-Nukleinsäure eingesetzt werden.

Figur 3 zeigt schematisch den Ablauf der bevorzugten Ausführungsform unter Verwendung einer Replikationsamplifikation.

Figur 4 zeigt in Kurve I das Ergebnis eines Experiments nach Figur 1. Aufgetragen sind gegeneinander die in der Lösung gemessene Extinktion gegen die Menge an nachzuweisender Nukleinsäure A; Kurve II gibt das Ergebnis ohne Anwesenheit der nachzuweisenden Nukleinsäure wieder.

- 30 -

Fig. 5 zeigt eine Eichkurve 1 für eine Bestimmung von HBV-DNA mittels PCR und einem einzelsträngigen biotinmarkierten Oligonukleotid gemäß Beispiel 2. Kurve 2 zeigt den Leerwert (ohne Zugabe von Bio-Oli 25).

Fig. 6 zeigt eine Eichkurve 3 für die Bestimmung von HBV in einem Verfahren gemäß Beispiel 3. Kurve 4 zeigt den Leerwert (ohne Zugabe von Bio-Oli 25).

Bezugszeichen:

- A template-Nukleinsäure
- A1 Gegenstrang von A
- P1 zu A komplementärer Primer
- E Enzym/Enzymkomplex
- E1 DNA-Polymerase oder reverse Transskriptase
- L nachweisbare Gruppe (Markierung)
- B Produkt der Reaktion a)
- C Nukleinsäuresonde
- I immobilisierbare Gruppe
- D Nukleinsäurehybrid aus B und C
- R immobilisierende Gruppe
- F feste Phase
- S1 zu A komplementäre Sequenz
- S1' andere zu A komplementäre Sequenz
- S2 Promotor- oder erste Replikationsinitiationssequenz (Replikationsursprung)
- S2' Promotor- oder zweite Replikationsinitiationssequenz (Replikationsursprung)
- Ad1 Adaptor 1, komplementär zur target-Nukleinsäure
- Ad2 Adaptor 2, komplementär zur target-Nukleinsäure

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1

Amplifikation der target-DNA unter Verwendung eines nachweisbar markierten Desoxyribonukleosidtriphosphats (Schritt a))

Polymerase chain reaction wird mit klonierten HBV-spezifischen Sequenzen durchgeführt. Die verwendeten Primer binden an die Position 1937-1960 und 2434-2460 im HBV-Genom, d.h. eine Sequenz von 523 Nukleotiden wird amplifiziert (R. Sumazaki et al., 1989, J. Med. Virol., 27, 304-308). Die Konzentration der zu amplifizierten DNA im Plasmid entspricht in der hier eingesetzten Verdunnungsreihe 100 ng bis 100 pg. 30 PCR-Zyklen (2' 92°C; 2' 50°C; 2' 70°C) werden in 100 µl mit Primern, je 200 nM; KCl, 50 mM; Tris HCl pH 8,5, 10 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM; Gelatine 100 µg/ml; dATP, 200 µM; dCTP, 200 µM, dGTP, 200 µM; dTTP, 150 µM; Digoxigenin-11-2'-desoxy-uridin-5'-dUTP (DIG-[11]-dUTP, Boehringer Mannheim), 50 µM; 2,5 U Thermus aquaticus (Taq) DNA-Polymerase durchgeführt.

Nichtthermische Denaturierung (Schritt e))

20 µl dieses Gemisches nach PCR und 40 ng Biotin-markierte Proben-DNA (random-geprimte, klonierte HBV-DNA zwischen Position 27 und 2604, doppelsträngig) werden in einem Gesamtvolumen von 44 µl in 0,5 M NaOH 10' bei 37°C denaturiert.

Hybridisierung mit Sonde C (Schritt b)) und  
Festphasenbindung (Schritt f)).

Anschließend wird durch Zugabe von 156  $\mu$ l Hybridisierungslösung von pH 5 neutralisiert und in eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte umpipettiert (Hybridisierungslösung = 62,5 mM Natriumphosphat, 6,25 x SSC [1 x SSC = NaCl, 0,15 M; Natriumzitrat, 0,015 M] und Formamid 62,5 %). Die Hybridisierung-/Wandbindungsreaktion wird 18 Stunden bei 37°C unter leichtem Schütteln durchgeführt.

Detektion des Hybrids D (Schritte c), g) und h)).

Nach Entfernen der Flüssigkeit und 5x Waschen mit 0,025 % NaCl und 1 % Kupfersulfat werden 200 mU/ml Anti-Digoxigenin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat zugegeben und 60' bei 37°C in Tris HCl, pH 7,5/10 mM; NaCl 0,9 %; BSA, 1 %; Pluronic T68 0,5 % inkubiert. Nach 5x waschen (gleiche Bedingungen wie oben) wird mit 0,1 % 2,2-Azino-di-[3-ethylbenzthiazol]-(ABTS) 60' bei 37°C inkubiert und die Extinktion bei 405 nm gemessen.

In Figur 4 sind die Extinktionen für diese Reaktion und für die Kontrollreaktion mit biomarkierter Probe gezeigt.

Beispiel 2

Die Amplifikationsreaktion (Polymerase chain reaction) wird mit Kontrollserum (HBV-DNA negativ) durchgeführt, das mit HBV-spezifischer DNA angereichert ist. Aufgrund der Lage der gewählten PCR-Primer wird bei der Amplifikation ein 523 bp großes DNA-Fragment gebildet (PCR-Primer 1: Position 1937-1960, PCR-Primer 2: Position 2434-2460 im HBV-Genom, Literatur siehe Beispiel 1). Es wird eine

Verdünnungsreihe des Plasmids in einem Bereich von 10 pg/ml bis 1,25 pg/ml in Kontrollserum hergestellt. Dies entspricht, bezogen auf den zu amplifizierenden DNA-Bereich des Plasmids, Mengen im Bereich von 40 ng bis 320 ng DNA, die in die Amplifikationsreaktion eingesetzt werden. Zur Alkalilysen werden 10 µl des mit Plasmid-DNA aufgestockten Kontrollserums mit 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) und 20 µl 0,5 N NaOH versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Neutralisation mit 20 µl 0,5 N HCl werden

10 µl des Lyseansatzes in die Amplifikationsreaktion eingesetzt. Die Reaktion erfolgt in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit je 200 nM der PCR-Primer, je 200 µM dATP, dCTP und dGTP, 175 µM dTTP, 25 µM Digoxigenin-11-2'-dUTP (Boehringer Mannheim), 2,5 U Thermus aquaticus DNA-Polymerase, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % Gelatine. Nach Überschichten der Lösung mit 100 µl Mineralöl erfolgt die Inkubation in einem Thermocycler (Perkin Elmer): 30 sec 92°C, 30 sec 50°C, 60 sec 70°C, insgesamt 30 Zyklen. Nach Beendigung der Amplifikation werden 40 µl des Ansatzes mit 10 µl 0,5 N NaOH versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation erfolgt durch Zugabe von 450 µl Hybridisierungslösung (50 mM Na-Phosphatpuffer, 0,75 M NaCl, 0,075 M Na-Citrat, 0,05 N HCl, 0,05 % RSA, pH 5,4) dem 220 ng/ml Biotin-markiertes Oligonukleotid (Bio-Oli 25, Biotin-markiert, gemäß Applied Biosystems, User Bulletin, DNA-Synthesizer Nr. 49, 1988, Position 2327-2356 im HBV-Genom), das komplementär zu einer Region des amplifizierten DNA-Bereiches ist. 200 µl des Hybridisierungsansatzes werden in einer Kavität einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte 3 h bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen der Lösung wird anschließend 2 x 10 min bei 37°C mit 0,3 M NaCl, 0,03 M

Na-Citrat, 0,2 % SDS und 1 x kurz bei Raumtemperatur mit 0,9 % NaCl gewaschen. 200 mU/ml anti-Digoxigenin-Antikörper-Meerrettichperoxidase-Konjugat in 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,9 % NaCl, 1 % RSA werden zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 3maligem Waschen mit 0,9 % NaCl wird die Substratlösung (1,9 mM ABTS<sup>R</sup>) zugefügt und die Extinktion bei 405 nm gemessen.

In Figur 5 sind die Ergebnisse der Reaktion graphisch dargestellt.

### Präispiel 3

HBe-positives Human-Plasma mit einem Virustiter von 1 x 10<sup>10</sup> Hepatitis B-Viren pro mol wird in Normalserum verdunnt, so daß der Virusgehalt der Verdünnungen zwischen 0,25 x 10<sup>5</sup>/ml bis 2 x 10<sup>5</sup>/ml liegt. Zur Lyse der Viren werden 10 µl der Serumverdünnung mit 10 µl 0,2 N NaOH versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die anschließende Neutralisation erfolgt durch Zugabe von 30 µl Neutralisationslösung (100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,3), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,02 % Gelatine, versetzt mit 10 µl des Lyseansatzes verwendet. Die Reaktion erfolgt in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit je 200 nM der beiden PCR-Primer, je 200 µm dATP, dCTP und dGTP, 175 µM dTTP, 25 µM Digoxigenin-11-2'-dUTP (Boehringer Mannheim), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % Gelatine, 2,5 U Thermus aquaticus DNA-Polymerase. Der Reaktionsansatz wird mit 100 µl Mineralöl überschichtet und in einem Thermo-Cycler (Perkin Elmer) 30 Zyklen inkubiert: 30 sec 92°C, 30 sec 50°C und 1 min 70°C.

Durch den Amplifikationsschritt wird ein 523 bp großes DNA-Fragment erzeugt (HBV-PCR-Primer 1: Position 1937-1960, HBV-PCR-Primer 2: Position 2434-2460 im HBV-Genom).

- 35 -

Der spezifische Nachweis der PCR-Produkte erfolgt in einem Zwei-Komponenten-Testsystem an der Festphase. Zunächst werden 20  $\mu$ l des Amplifikationsansatzes mit 20  $\mu$ l TE-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA) und 10  $\mu$ l 0,5 N NaOH versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation erfolgt durch Zugabe von 450  $\mu$ l angesäuerter Hybridisierungslösung (50 mM Na-Phosphatpuffer, 0,05 N HCl, 0,75 M NaCl, 0,075 M Na-Citrat, 0,05 % RSA, pH 5,4), der 100 ng/ml eines Biotin-markierten Oligonukleotids zugesetzt ist, das einer Region des amplifizierten DNA-Bereiches entspricht (HBV-Biotin-Oligonukleotid, 30mer, 2fach Biotin-markiert, Position 2327-2356 im HBV-Genom, Bio-Oli 25, hergestellt durch Festphasensynthese, biotinmarkiert wie unter Beispiel 2 beschrieben). 200  $\mu$ l dieses Hybridisierungsansatzes werden in einer Kavität einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte 3 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Hybridisierungs- und Wandbindungsreaktion wird die Lösung abgesaugt und 2 x 10 min mit 0,3 M NaCl, 0,03 M Na-Citrat, 0,2 % SDS bei 37°C und 1 x kurz mit 0,9 % NaCl bei Raumtemperatur gewaschen. Nach Zugabe von 200 mU/ml anti-Digoxigenin-Antikörper-Meerrettichperoxidase-Konjugat in 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,9 % NaCl, 1 % RSA wird 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Ungebundenes Konjugat wird durch 3maliges Waschen mit 0,9 % NaCl bei Raumtemperatur entfernt. Nach 30minütiger Inkubation mit 1,9 mM ABTS<sup>R</sup> (2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulfonsäure (6)]-diammoniumsalz) bei 37°C wird die Extinktion bei 405 nm mittels eines ELISA-Readers gemessen. Die Ergebnisse sind in Figur 6 dargestellt.

**ERSATZBLATT**

Patentansprüche

1. Verfahren zum spezifischen Nachweis einer Nukleinsäure in einer Probe, welches folgende Schritte umfaßt:
  - a) Reaktion der Probe mit einem oder mehreren markierten Mononukleosidtriphosphaten und einem oder mehreren Enzymen, welche die Herstellung einer markierten Nukleinsäure B katalysieren, die dieses Nukleotid enthält,
  - b) Reaktion der Probe mit einer Nukleinsäuresonde C, welche hinreichend komplementär zu der Nukleinsäure B ist, und
  - c) Nachweis des aus markierter Nukleinsäure B und Nukleinsäuresonde C gebildeten Nukleinsäurehybrids D,
- dadurch gekennzeichnet, daß,
  - d) die Nukleinsäuresonde mindestens eine immobilisierbare Gruppe enthält,
  - e) die Reaktionsmischung nach Schritt a) einer nichtthermischen Denaturierung unterzogen wird,
  - f) das Nukleinsäurehybrid D mit einer festen Phase, welche die immobilisierbare Nukleinsäuresonde C spezifisch binden kann, in Kontakt gebracht wird,

**ERSATZBLATT**

- g) die flüssige von der festen Phase getrennt wird und
- h) die an die feste Phase gebundene nachweisbare Gruppe nachgewiesen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Reaktion a) in Anwesenheit eines spezifischen Starters abläuft.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym bzw. der Enzymkomplex die Polymerisation von Nukleosidtriphosphaten zu einer zu der Nukleinsäure A im wesentlichen komplementären Nukleinsäure B katalysiert.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleosidtriphosphate Ribonukleosidtriphosphate umfassen.
5. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß in Reaktion a) als spezifischer Starter ein Primer P1 benutzt wird, der zu einem Teil der Nukleinsäure A im wesentlichen komplementär ist und von dem Enzym unter Einbau des Mononukleosidtriphosphats zu einer zu der Nukleinsäure A im wesentlichen komplementären Nukleinsäure B verlängert wird.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß außerdem ein Primer P2 benutzt wird, der zu einem Teil der Nukleinsäure B im wesentlichen komplementär ist.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleosidtriphosphate Desoxyribonukleosidtriphosphate umfassen.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die nachzuweisende Nukleinsäure einzelsträngig ist oder gemacht wird, der Probe dann mindestens ein Adaptor pro nachzuweisendem Einzelstrang zugegeben wird, welcher eine zu einem Teil der nachzuweisenden Nukleinsäure im wesentlichen komplementäre Nukleotidsequenz und eine Replikationsinitiationsregion enthält, der Adaptor um eine zu der Nukleinsäure komplementäre Sequenz verlängert wird, und die so gebildete Nukleinsäure als template-Nukleinsäure in Reaktion a) eingesetzt wird.
9. Verfahren nach einer der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die nachzuweisende Nukleinsäure einzelsträngig ist oder gemacht wird, der Probe dann mindestens ein Primer pro nachzuweisendem Einzelstrang zugesetzt wird, welcher eine zu einem Teil der nachzuweisenden Nukleinsäure im wesentlichen komplementäre Nukleotidsequenz und eine Transkriptionsinitiationssequenz enthält, der Primer um eine zu der nachzuweisenden Nukleinsäure komplementäre Nukleotidsequenz verlängert und die so gebildete Nukleinsäure als template-Nukleinsäure in Reaktion a) eingesetzt wird.
10. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt a) gebildete Nukleinsäure B als template-Nukleinsäure erneut in Reaktion a) eingesetzt wird.

11. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Reaktion a) mehrmals hintereinander ausgeführt wird, wobei jeweils die Produkte der Reaktion wieder als Ausgangsstoffe der erneuten Reaktion dienen.
12. Verfahren gemäß Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß in Reaktion a) ein Nukleinsäurehybrid aus Nukleinsäure A und Nukleinsäure B gebildet wird.
13. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Denaturierung bei alkalischem pH stattfindet.
14. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Denaturierung durch Zugabe chaotroper Salze vorgenommen wird.
15. Verfahren gemäß Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Denaturierung in einem Temperaturbereich zwischen 17°C und 50°C stattfindet.
16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 13, 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß das gesamte Nachweisverfahren in einem Temperaturbereich zwischen 17°C und 50°C stattfindet.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das gesamte Nachweisverfahren bei einer einzigen Temperatur stattfindet.

- 40 -

18. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresonde in einer Lösung mit einem pH zwischen 3.0 und 6.5 zugegeben wird.
19. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung außerdem alle für die Durchführung der Hybridisierung erforderlichen Reagenzien enthält.
20. Verfahren gemäß Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresonde C eine einzelsträngige Nukleinsäure C1 ist, deren Gegenstrang nicht in der Lösung vorhanden ist.
21. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresonde C in einer Lösung mit einem pH zwischen 10 und 14 zugegeben wird und anschließend mit der Hybridisierungslösung in der Mischung ein pH zwischen 5.0 und 8.5 eingestellt wird.
22. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß zunächst eine Lösung der Sonde mit der Probe vereinigt, dann ein pH zwischen 10 und 14 eingestellt wird und anschließend in der Mischung ein pH zwischen 5.0 und 8.5 eingestellt wird.
23. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die durch Verlängerung der Primer P1 und P2 gebildeten Nukleinsäuren nach Strangtrennung erneut mit P1 und P2 umgesetzt werden, wobei die mit dem einen Primer neu gebildeten Stränge jeweils als template für die Verlängerung des anderen Primers dienen.

**ERSATZBLATT**

1/6

FIG. 1

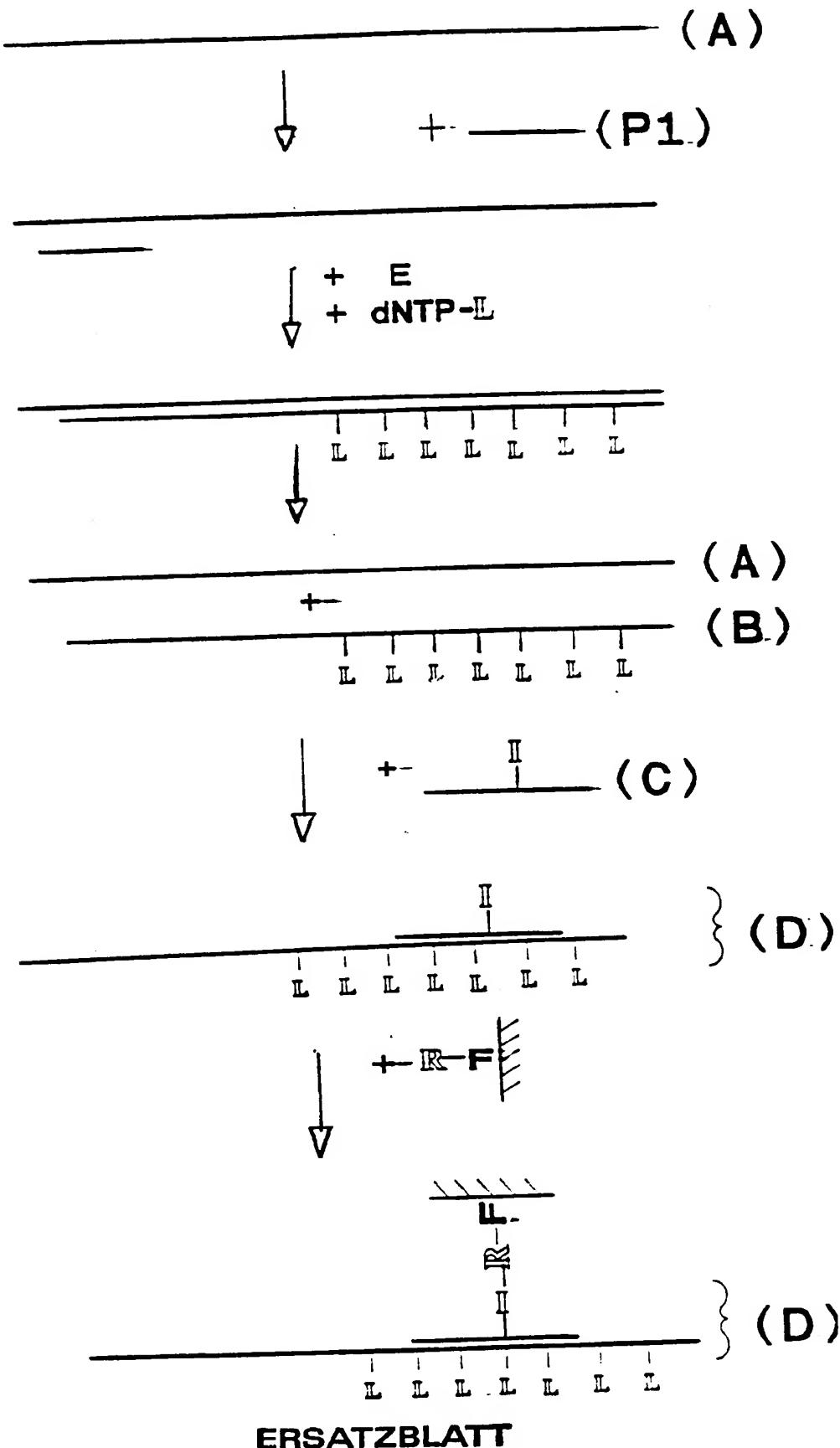
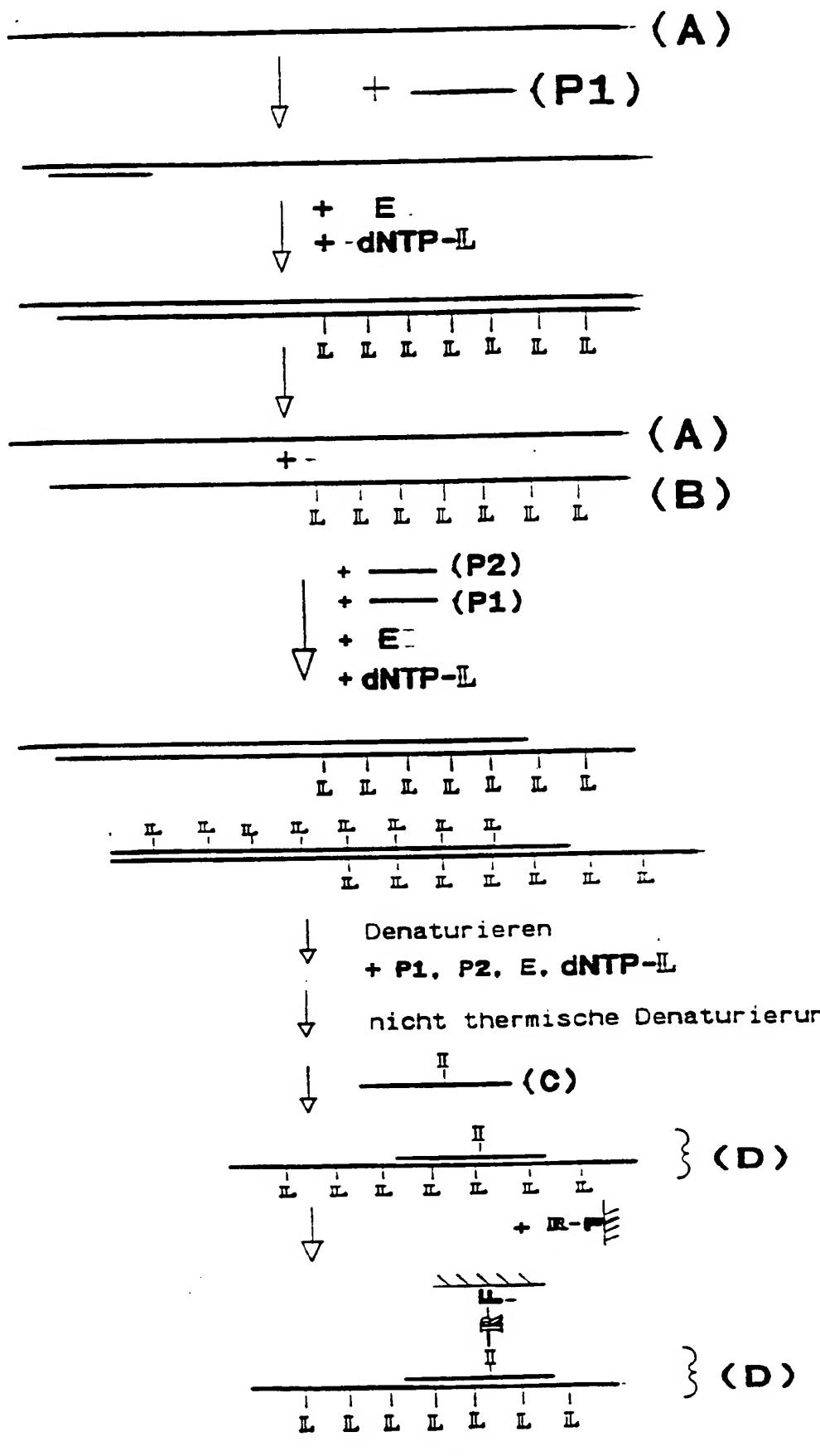
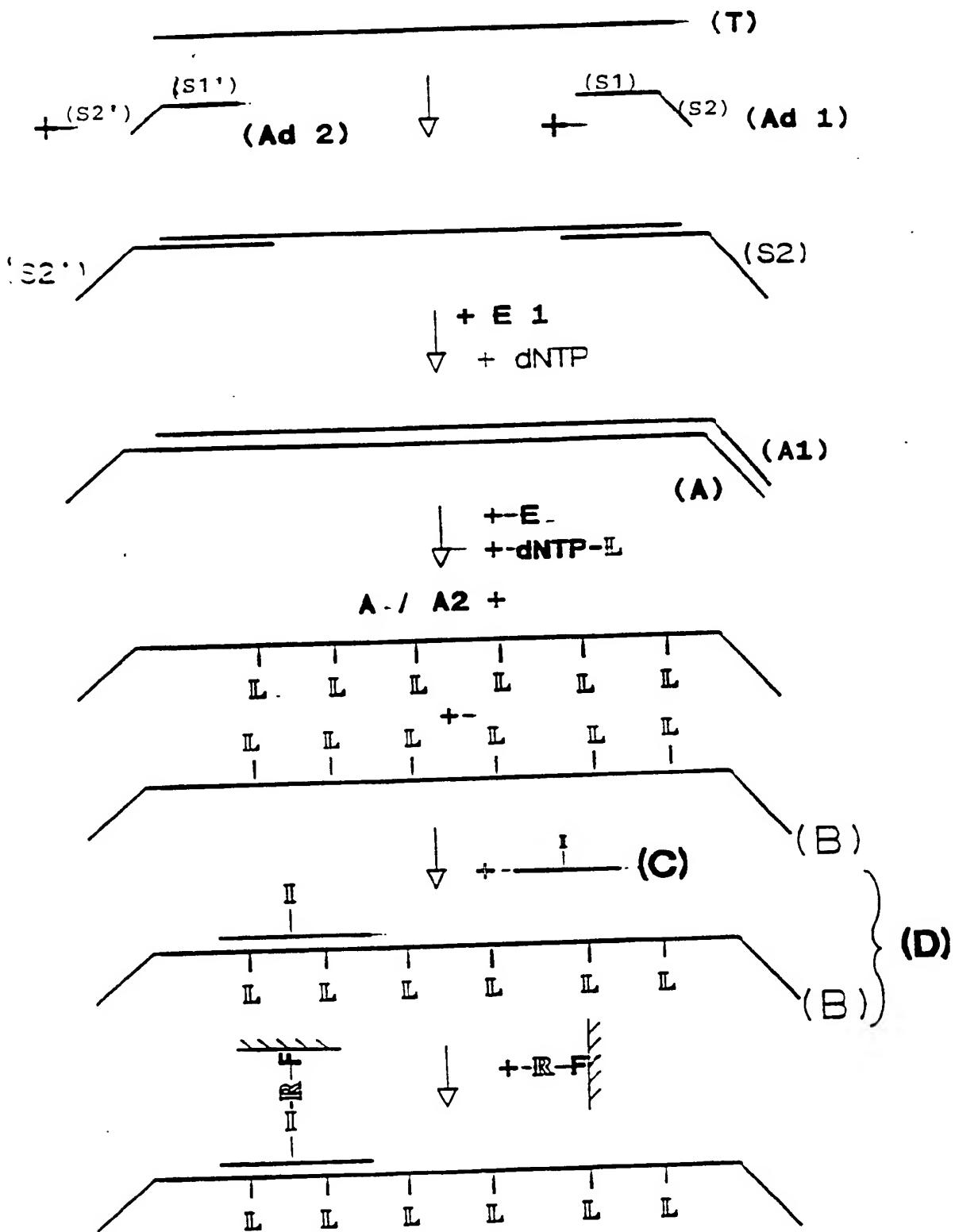


FIG. 2

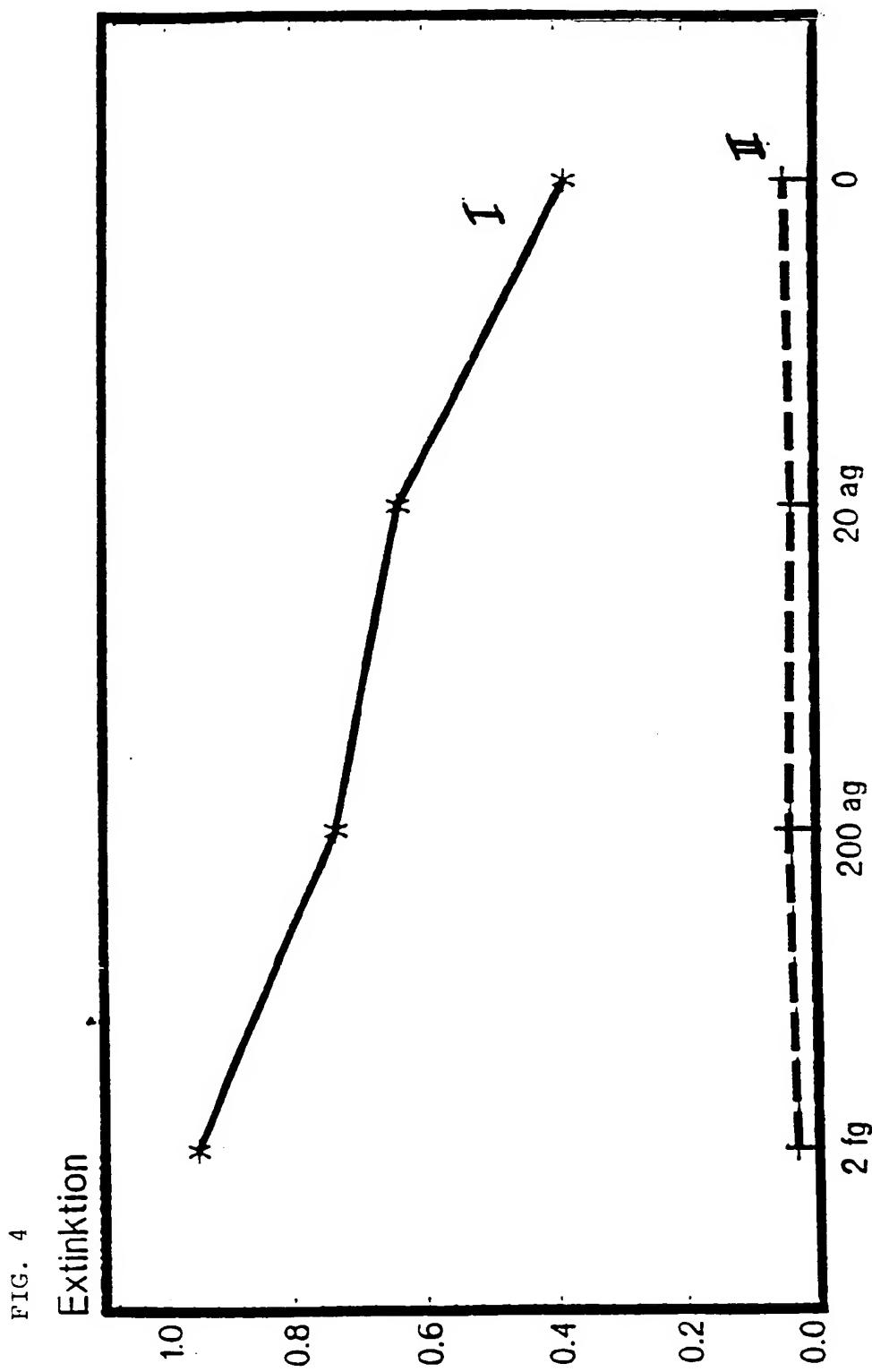


3/6

FIG. 3

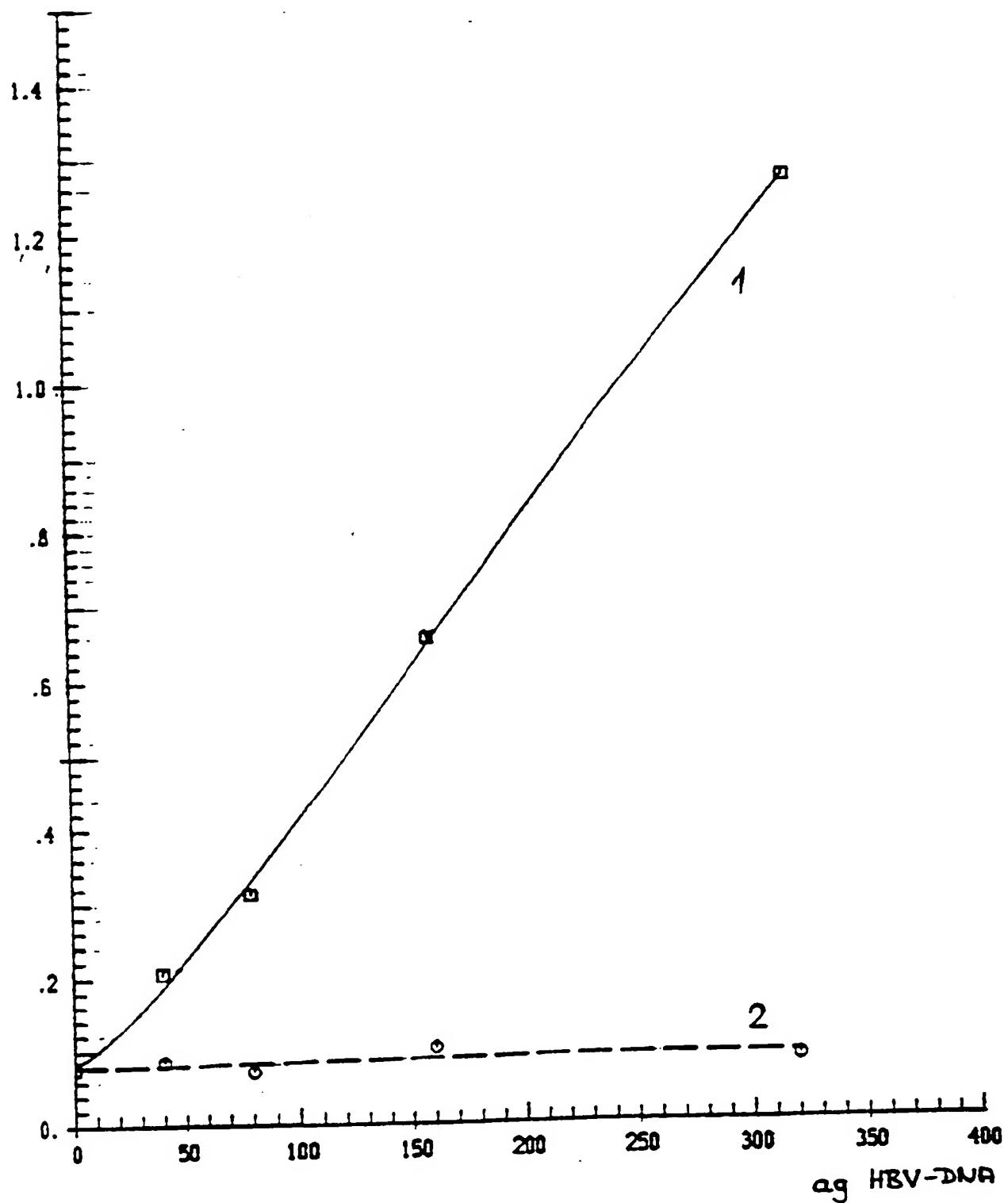
**ERSATZBLATT**

4/6



5/6

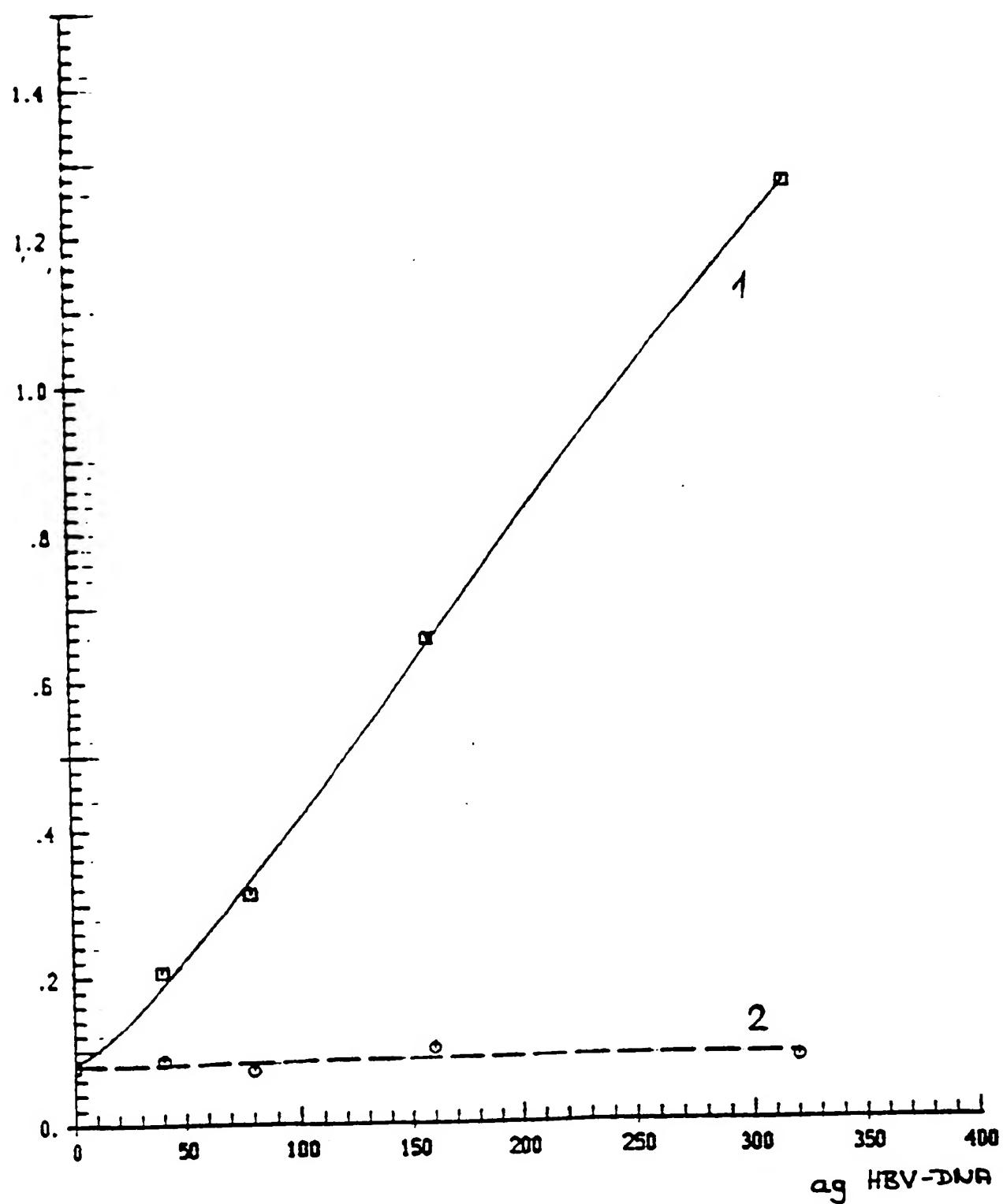
FIG. 5



ERSATZBLATT

6/6

FIG. 6



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP91/01898

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) \*

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl<sup>5</sup>: C12Q 1/68

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ?

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl <sup>5</sup>	C12Q

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched \*

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT\*

Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
A	WO, A, 9011374 (DU PONT DE NEMOURS & CO) 4 October 1990 see claim 1 ---	1-7, 10-12,23
A	GB, 2202328 (ORION-YHTYMA OY) 21 September 1988 see claims 3-5 ---	1-7, 10-12,23
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA Volume 86, August 1989, WASHINGTON US pages 6230-6234; R. K. SAIKI ET AL : "Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence specific oligonucleotide probes" (cited in the application) see abstract ---	1-7, 10-12,23
A	EP, A, 0329822 (CANGENE CORP) 30 August 1989 see page 3, line 25 - page 4, line 34 ---	8,9
A	AT, B, 390080 (LION THOMAS) 12 March 1990 see abstract ---	13
P,A	EP, A, 0395398 (LIFE TECNOLOGIES) 31 October 1990 see example 2 ---	1,15-22

\* Special categories of cited documents: <sup>10</sup>

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
18 December 1991 (18.12.91)	17 January 1992 (17.01.92)
International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. EP 9101898  
SA 51753

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 18/12/91

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9011374	04-10-90	AU-A- CA-A-	5359690 2012982	22-10-90 27-09-90
GB-A-2202328	21-09-88	AU-A- CH-A- DE-A- FR-A- JP-A- LU-A- NL-A- SE-A-	1193788 677285 3807994 2613077 63243875 87153 8800594 8800864	15-09-88 30-04-91 22-09-88 30-09-88 11-10-88 23-08-88 03-10-88 12-09-89
EP-A-0329822	30-08-89	WO-A- JP-A-	9102814 2005864	07-03-91 10-01-90
AT-B-390080	12-03-90	None		
EP-A-0395398	31-10-90	US-A- CA-A- JP-A-	5043272 2013800 2303489	27-08-91 27-10-90 17-12-90

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 91/01898

## I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)<sup>6</sup>

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Kl. 5 C12Q1/68

## II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff<sup>7</sup>

Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole
Int.Kl. 5	C12Q

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen<sup>8</sup>

## III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup>

Art. <sup>10</sup>	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
A	WO,A,9 011 374 (DU PONT DE NEMOURS & CO) 4. Oktober 1990 siehe Anspruch 1 ---	1-7, 10-12,23
A	GB,A,2 202 328 (ORION-YHTYMA OY) 21. September 1988 siehe Ansprüche 3-5 ---	1-7, 10-12,23
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. Bd. 86, August 1989, WASHINGTON US Seiten 6230 - 6234; R. K. SAIKI ET AL: 'Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence specific oligonucleotide probes' in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung ---	1-7, 10-12,23

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup> :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

## IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. DEZEMBER 1991

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17. 01. 92

Internationale Recherchenbehörde

EUROPAISCHES PATENTAMT

Unterschrift des bevoilichtigten Bediensteten

MOLINA GALAN E.

## III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP,A,0 329 822 (CANGENE CORP) 30. August 1989 siehe Seite 3, Zeile 25 - Seite 4, Zeile 34 ----	8,9
A	AT,B,390 080 (LION THOMAS) 12. März 1990 siehe Zusammenfassung ----	13
P,A	EP,A,0 395 398 (LIFE TECNOLOGIES) 31. Oktober 1990 siehe Beispiel 2 ----	1,15-22

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9101898  
SA 51753

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

18/12/91

im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9011374	04-10-90	AU-A- CA-A-	5359690 2012982	22-10-90 27-09-90
GB-A-2202328	21-09-88	AU-A- CH-A- DE-A- FR-A- JP-A- LU-A- NL-A- SE-A-	1193788 677285 3807994 2613077 63243875 87153 8800594 8800864	15-09-88 30-04-91 22-09-88 30-09-88 11-10-88 23-08-88 03-10-88 12-09-89
EP-A-0329822	30-08-89	WO-A- JP-A-	9102814 2005864	07-03-91 10-01-90
AT-B-390080	12-03-90	Keine		
EP-A-0395398	31-10-90	US-A- CA-A- JP-A-	5043272 2013800 2303489	27-08-91 27-10-90 17-12-90

EPO FORM P0073

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

